

## SVT, ÉPREUVE SUR SUPPORT DE DOCUMENTS

### BIOLOGIE

Durée : 2 heures

**L'usage d'abaques, de tables, de calculatrice et de tout instrument électronique susceptible de permettre au candidat d'accéder à des données et de les traiter par les moyens autres que ceux fournis dans le sujet est interdit.**

Chaque candidat est responsable de la vérification de son sujet d'épreuve : pagination et impression de chaque page. Ce contrôle doit être fait en début d'épreuve. En cas de doute, il doit alerter au plus tôt le surveillant qui vérifiera et, éventuellement, remplacera le sujet.

Ce sujet comporte 9 pages numérotées de 1 à 9 et une annexe format A3.

Si, au cours de l'épreuve, un candidat repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il le signale sur sa copie et poursuit sa composition en expliquant les raisons des initiatives qu'il a été amené à prendre.

### **Les flux d'azote « occultes » dans les écosystèmes forestiers : quantification, bases biologiques et métaboliques**

Vous répondrez aux questions posées en construisant méthodiquement votre argumentation sur l'analyse des documents proposés et sur vos connaissances et en adéquation avec les **consignes explicites** propres à chaque question. Les réponses seront **précises, concises et structurées**.

L'annexe sera complétée et obligatoirement rendue avec la copie.

Le sujet comporte **3 thèmes indépendants** et un thème 4 (bilan). Un **schéma bilan** est demandé en **fin de thème 4**.

Aucune introduction ni conclusion ne sont demandées.

Les barres verticales sur les graphes et histogrammes représentent l'écart type ou l'erreur standard à la moyenne. On admettra que les résultats sont différents si les barres d'erreurs ne se chevauchent pas.

#### Références bibliographiques

[1] Bal & Chanway (2012) *Botany*, **90**, 891–896.

[2] Bal *et al.* (2012) *Can. J. For. Res.*, **42**, 807–813.

[3] Johnson & Turner (2014) *For. Ecol. Manag.*, **318**, 370–379.

[4] Paungfoo-Lonhienne *et al.* (2010) *PLoS ONE*, **5**, e11915.

[5] Schmidt *et al.* (2013) *Functional Plant Biology*, **40**, 425.

[6] Selosse *et al.* (2017) *Ecology Letters*, **20**, 246–263.

[7] Tang *et al.* (2017) *Botany*, **95**, 611–619.

#### Introduction

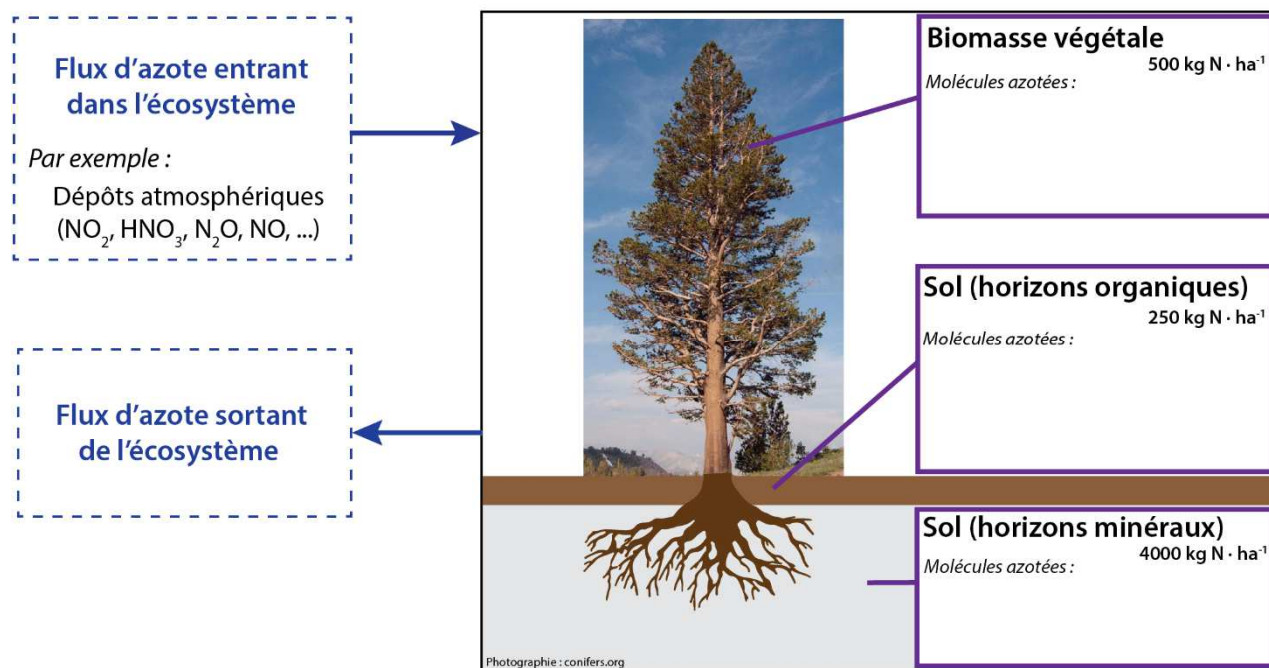
Si le cycle de l'azote est plutôt bien caractérisé à l'échelle planétaire, la quantification précise des flux d'azote est plus délicate, notamment aux courtes échelles de temps. De nombreuses études ont tenté de quantifier les transferts d'azote entre les différents réservoirs de plusieurs écosystèmes, avec des résultats parfois déconcertants. Certains auteurs ont pris l'habitude d'appeler « azote occulte » les différences importantes entre les bilans de matière calculés (entrées et sorties) et la teneur effective des écosystèmes. Ces flux d'azote « cachés » correspondent à des processus (physico-chimiques, biologiques) mal pris en compte dans les calculs, ou à des biais expérimentaux.

Dans ce sujet, on se propose d'étudier quelques pistes qui pourraient expliquer les différences entre les prévisions des modèles et les bilans de masse effectués dans les écosystèmes.

## Thème 1 — Les flux d'azote dans les écosystèmes forestiers

Plusieurs forêts de l'État du Tennessee (États-Unis d'Amérique) ont fait l'objet de suivis scientifiques à très long terme. Lors de ces études, des mesures de quantités d'azote ont été réalisées dans les végétaux présents dans la forêt, dans les horizons organiques du sol et les horizons minéraux du sol. Les horizons sont des couches plus ou moins parallèles qui constituent un sol.

Le document 1 représente schématiquement les différents réservoirs d'azote dans un de ces écosystèmes. Le document 2 présente les résultats de plusieurs de ces études dans deux forêts comparables et voisines : *Oak Ridge* et *Walker Branch*.



**Document 1.** Représentation schématique des réservoirs d'azote dans un écosystème forestier. Les masses d'azote sont données à titre indicatif, pour la forêt de *Walker Branch* en 2004 [3].

### Question 1

Sous quelles formes l'azote se trouve-t-il dans chacun des trois réservoirs de cet écosystème forestier ? Vous répondrez à cette question directement sur le schéma (reproduit en **annexe**) en nommant plusieurs exemples de molécules azotées dans chaque cadre violet (à droite).

*Aucun texte explicatif n'est attendu.*

### Question 2

À partir des données du **document 2** :

**2.1.** Comparez la variation annuelle de la quantité d'azote ( $a + b + c$ ) aux dépôts atmosphériques pour ces quatre écosystèmes.

**2.2.** Formulez des hypothèses pouvant expliquer les accumulations et les pertes d'azote dans les écosystèmes forestiers (10 lignes maximum).

Lieu de l'étude	Durée de l'étude	Variation annuelle de la quantité d'azote (en kg · ha <sup>-1</sup> · an <sup>-1</sup> )			Total (a + b + c)	Dépôts atmosphériques calculés (en kg · ha <sup>-1</sup> · an <sup>-1</sup> )
		Biomasse végétale (a)	Horizons organiques du sol (b)	Horizons minéraux du sol (c)		
<i>Oak Ridge</i> (1)	15 ans	6	- 8	55	53	10
<i>Oak Ridge</i> (2)	15 ans	5	- 1	83	87	10
<i>Walker Branch</i> (1)	21 ans	- 0,7	- 2,1	- 70,4	- 73,2	10
<i>Walker Branch</i> (2)	11 ans	8,3	10,1	23,4	42,8	10

**Document 2.** Variation des quantités d'azote mesurées dans différents réservoirs de plusieurs forêts de l'État du Tennessee au cours de plusieurs études de durées différentes [3]. Les dépôts atmosphériques correspondent aux entrées (naturelles et anthropiques) de molécules azotées en provenance de l'atmosphère, calculées dans la région. Les forêts de *Oak Ridge* et *Walker Branch* sont comparables sur le plan des espèces végétales présentes, de leur âge, des conditions climatiques et de la gestion humaine. Les deux sites de *Oak Ridge* sont étudiés durant 15 ans. Pour *Walker Branch*, il s'agit du même site, d'abord étudié entre 1972 et 1993, puis entre 1993 et 2004.

## Thème 2 — Étude de bactéries endophytes du conifère *Pinus contorta*

Le pin tordu latifolié (*Pinus contorta*) est un conifère très répandu en Amérique du Nord, particulièrement abondant et productif sur des sols pauvres en azote. L'hypothèse d'une fixation de l'azote atmosphérique par des bactéries en relation avec *Pinus contorta* est étudiée ici. Le concept de « bactérie endophyte diazotrophe » désigne les bactéries fixatrices de diazote atmosphérique capables de coloniser les tissus végétatifs des plantes.

### Partie 2.1 — Caractérisation et identification de bactéries diazotrophes

Dans un premier temps, les bactéries présentes dans les tissus (feuilles, tiges et racines) de *P. contorta* sont isolées et identifiées (document 3A). Dans un second temps, chacune de ces espèces bactériennes est mise en contact avec de l'acétylène (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) pour tester leur éventuelle activité nitrogénase (document 3B et 3C).

#### Question 3

Justifiez le protocole expérimental permettant d'obtenir le **document 3C** :

- Pourquoi injecter de l'acétylène ?
- Pourquoi mesurer la quantité d'éthylène ?

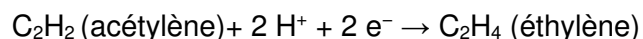
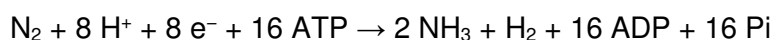
#### Question 4

Interprétez les résultats du **document 3** dans son ensemble.

**3A :**

Tissu	Jeunes plants (2 à 4 ans) n = 14		Arbres (> 20 ans) n = 21	
<b>Feuilles</b>	<i>Bacillus</i> sp. <i>Paenibacillus pabuli</i>	<i>Paenibacillus polymyxa</i> <i>Paenibacillus gordonae</i>	<i>Bacillus pumilus</i> <i>Paenibacillus</i> sp.	<i>Paenibacillus polymyxa</i> <i>Paenibacillus gordonae</i>
<b>Tiges et troncs</b>	<i>Bacillus</i> sp. <i>B. megaterium</i> <i>Brevibacillus</i> sp.	<i>Paenibacillus</i> sp. <i>Paenibacillus peoriae</i> <i>Paenibacillus polymyxa</i>	<i>Bacillus</i> sp. <i>B. licheniformis</i> <i>B. longisporus</i> <i>B. megaterium</i> <i>B. mycoides</i> <i>B. pumilus</i> <i>Brevibacillus</i> sp.	<i>Brevundimonas vesicularis</i> <i>Cellulomonas biazotea</i> <i>Kocuria</i> spp. <i>Paenibacillus</i> sp. <i>Paenibacillus polymyxa</i> <i>Pseudomonas</i> sp.
<b>Racines</b>	<i>Bacillus</i> sp.		Aucune souche bactérienne isolée	

**3B :** La nitrogénase peut catalyser plusieurs réactions parmi lesquelles :

**3C :**

Isolat bactérien	Tissu d'origine	Identité	Production d'éthylène (en pmol · mL <sup>-1</sup> · h <sup>-1</sup> )
P2b-2R	Tige de <i>P. contorta</i>	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	27,2 ± 9,5
P18b-2R	Feuilles de <i>P. contorta</i>	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	122,6 ± 61,0

**Document 3.** Isolement, identification, culture et mesure de l'activité nitrogénase de souches bactériennes présentes dans les organes végétatifs de *Pinus contorta* dans deux forêts de Colombie-Britannique, au Canada [2].

**3A :** résultats de l'identification par *GC-FAME* (chromatographie en phase gazeuse sur les acides gras) des bactéries présentes dans les feuilles, les tiges et les racines de *Pinus contorta*.

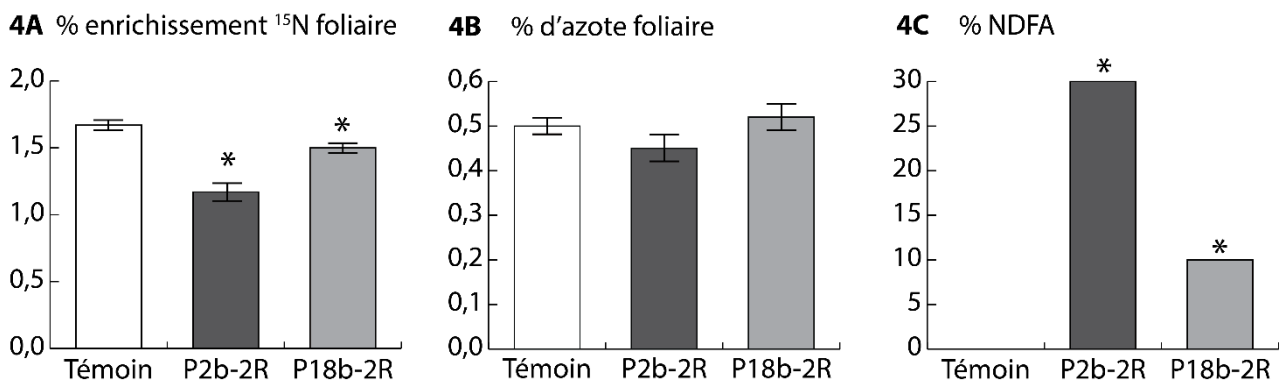
**3B :** deux réactions chimiques catalysées par l'enzyme nitrogénase.

**3C :** résultats de l'injection d'acétylène dans le milieu de culture. Parmi toutes les souches bactériennes identifiées dans le document 3A, seules deux d'entre elles provoquent une réaction significative (un dégagement d'éthylène) en présence d'acétylène. Le résultat, donné en picomoles (10<sup>-12</sup> mol) d'éthylène par mL et par heure, est une moyenne et son erreur standard.

## Partie 2.2 — Inoculation de plantules de *Pinus contorta* avec des bactéries diazotrophes

Les expériences suivantes ont pour objectif de vérifier si la capacité des bactéries isolées précédemment (souches P2b-2R et P18b-2R de l'espèce *Paenibacillus polymyxa*) à fixer l'azote a un effet sur *Pinus contorta*.

Des graines de *P. contorta* sont cultivées dans un milieu nutritif pendant 27 semaines. Pendant les deux premières semaines après le semis, le milieu est saturé avec une solution nutritive contenant du Ca(<sup>15</sup>NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, puis arrosé avec de l'eau distillée et un milieu nutritif non marqué (Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> non marqué) pendant les 25 semaines restantes. À la fin de l'expérience, les plantules sont prélevées, les organes sont séchés et analysés par spectrométrie de masse (**document 4**).



**Document 4.** Résultats de l'analyse des feuilles des plantules de *Pinus contorta* après 27 semaines de culture par spectrométrie de masse [1].

3 lots de plantules sont utilisés :

- P2b-2R : lors du semis, les graines sont inoculées avec 5 mL de bactéries *P. polymyxa* souche P2b-2R.
- P18b-2R : lors du semis, les graines sont inoculées avec 5 mL de bactéries *P. polymyxa* souche P18b-2R.
- Témoin : lors du semis, les graines sont arrosées avec 5 mL de bactéries *P. polymyxa* souche P2b-2R préalablement tuées à la chaleur.

Les valeurs affectées d'un astérisque (\*) sont significativement différentes des valeurs témoins.

**4A** : enrichissement des feuilles des plantules en isotope <sup>15</sup>N (en % de masse sèche). Par exemple, les feuilles du témoin sont 1,7 % plus riches en <sup>15</sup>N qu'une plante arrosée avec des nitrates non marqués.

**4B** : teneur en azote total des feuilles des plantules (en % de masse sèche).

**4C** : calcul du NDFA (*Nitrogen derived from atmosphere*). Le NDFA se calcule en comparant l'enrichissement en isotope <sup>15</sup>N d'une plante inoculée avec des bactéries diazotrophes et d'une plante non inoculée :

$$NDFA = \left( 1 - \frac{\% \text{ Enrichissement en } ^{15}\text{N dans une plante inoculée}}{\% \text{ Enrichissement en } ^{15}\text{N dans une plante non inoculée}} \right) \times 100$$

### Question 5

- 5.1. Expliquez quel est l'objectif de la mesure de la teneur en <sup>15</sup>N dans les feuilles des plantules.
- 5.2. Justifiez l'utilisation du calcul du NDFA pour répondre à l'objectif de cette expérience.

### Question 6

Interprétez les résultats du **document 4**.

## Partie 2.3 — Effets des bactéries diazotrophes endophytes sur la croissance de *Pinus contorta*

L'effet de la colonisation de la tige et des feuilles de *Pinus contorta* par des bactéries diazotrophes endophytes est évalué. Des jeunes plants de *Pinus contorta* sont cultivés pendant 12 mois dans un milieu nutritif stérile, préalablement infecté ou non par la souche P2b-2R de la bactérie *Paenibacillus polymyxa*. Le document 5 résume les résultats de ces expériences.

### Question 7

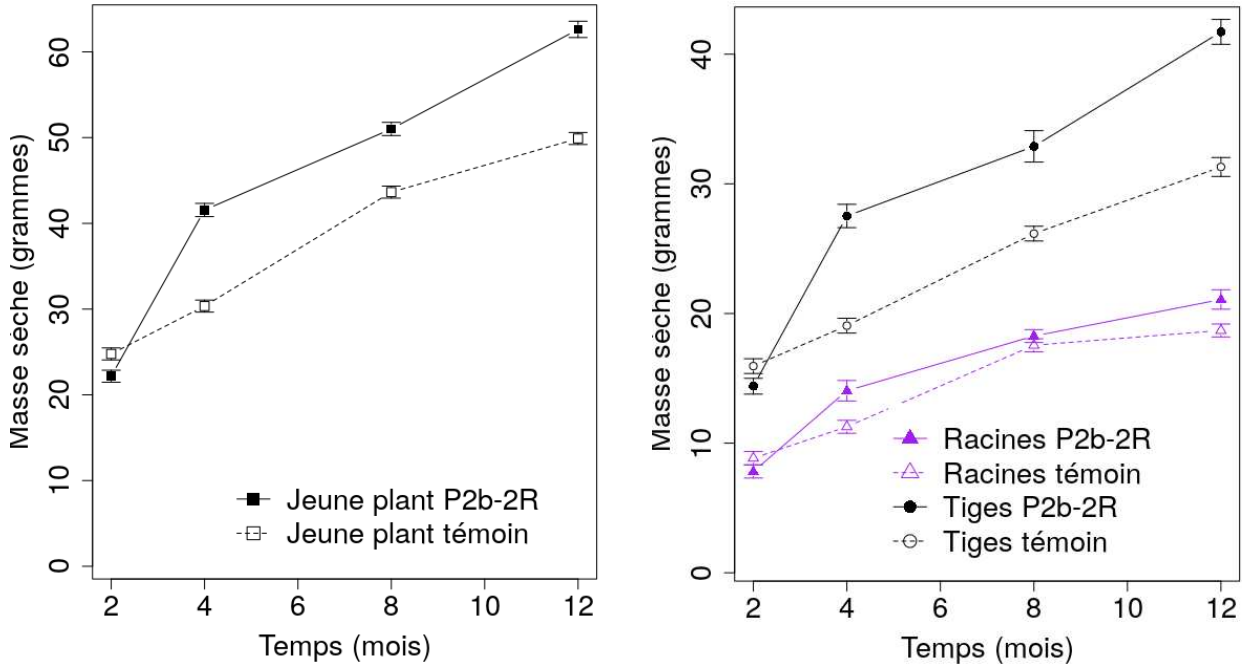
- 7.1. Quelles informations le **document 5A** apporte-t-il ?
- 7.2. Interprétez les résultats du **document 5B**.
- 7.3. Quelles informations le **document 5C** apporte-t-il ?

5A :

	Plants P2b-2R	Plants témoins
Tiges	4,11 ± 0,13	0
Racines	4,12 ± 0,03	0

Données en log UFC (nombre de colonies bactériennes) par gramme de tissu sec.

5B :



5C :

	Plants P2b-2R	Plants témoins
NDA (%) à 12 mois	40	0

**Document 5.** Résultat des expériences de croissance de jeunes plants de *P. contorta* infectées par *P. polymyxa* P2b-2R ou en milieu stérile (témoin) [7].

**5A** : comptage du nombre de colonies de *P. polymyxa* dans les tissus des jeunes plants de *Pinus contorta* au bout de 12 mois.

**5B** : évolution de la masse des organes (racine, tige) et des jeunes plants entiers au cours des 12 mois d'expérience.

**5C** : avec le même protocole expérimental que celui décrit dans le document 4, le NDA est calculé à la fin des 12 mois d'expérience.

### Question 8

Formulez, en quelques phrases, l'ensemble des conclusions de l'analyse des documents 3 à 5 concernant les flux d'azote entre *Pinus contorta* et les bactéries endophytes diazotrophes.

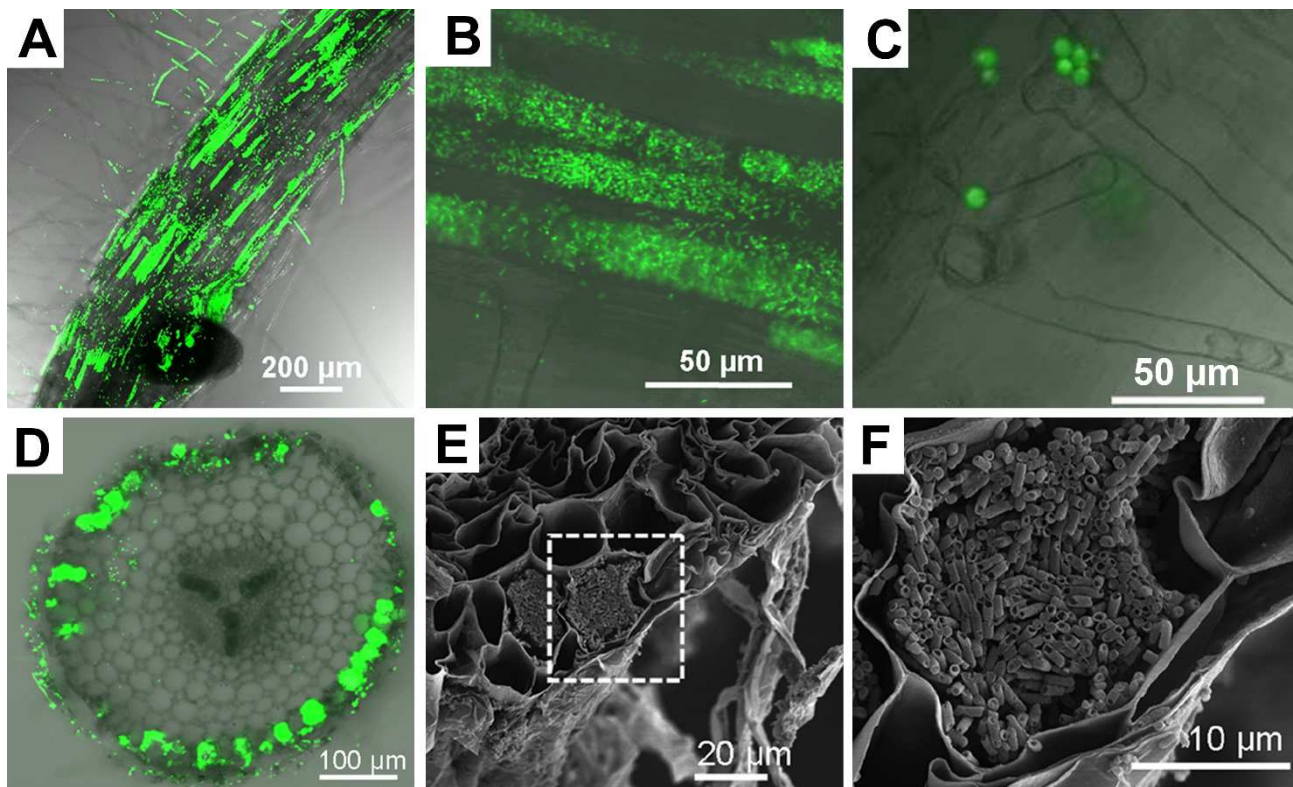
## Thème 3 — Interactions plantes – micro-organismes et flux d'azote dans la rhizosphère.

L'objectif de cette partie est de caractériser les flux d'azote organique au niveau des racines des végétaux.



Dans cette étude, plusieurs expériences mettent en contact deux souches de micro-organismes non pathogènes et non symbiotiques (*Escherichia coli* et *Saccharomyces cerevisiae*) avec des racines de plants de tomates *Lycopersicon esculentum*. Les bactéries et les levures ont été modifiées génétiquement pour exprimer une protéine fluorescente (GFP). On note <sup>GFP</sup>*E. coli* et <sup>GFP</sup>*S. cerevisiae* ces deux souches modifiées. Bien que la tomate soit capable de réaliser des symbioses mycorhiziennes dans la nature, elle est ici cultivée dans un milieu dépourvu de symbionte.

Les plants de tomates sont cultivés dans un milieu nutritif liquide pendant trois semaines. Ce milieu est ensuite additionné de 20 mL de suspension de <sup>GFP</sup>*E. coli*, ou le même volume de microbilles de silice fluorescentes de 5 µm de diamètre. Après 12h d'incubation, les racines sont préparées pour des observations microscopiques (**document 6**).



**Document 6.** Micrographies de racines de tomates observées en microscopie confocale à balayage laser (6A à 6D) et en microscopie électronique à balayage (6E et 6F) [4].

**6A** et **6B** : racines incubées avec <sup>GFP</sup>*E. coli*.

**6C** : racines incubées avec des microbilles de silice fluorescentes.

**6D** : coupe transversale de racine incubée avec <sup>GFP</sup>*E. coli*.

**6E** : racine incubée avec <sup>GFP</sup>*E. coli* coupée transversalement.

**6F** : détail de l'image 6E (cadre pointillé).

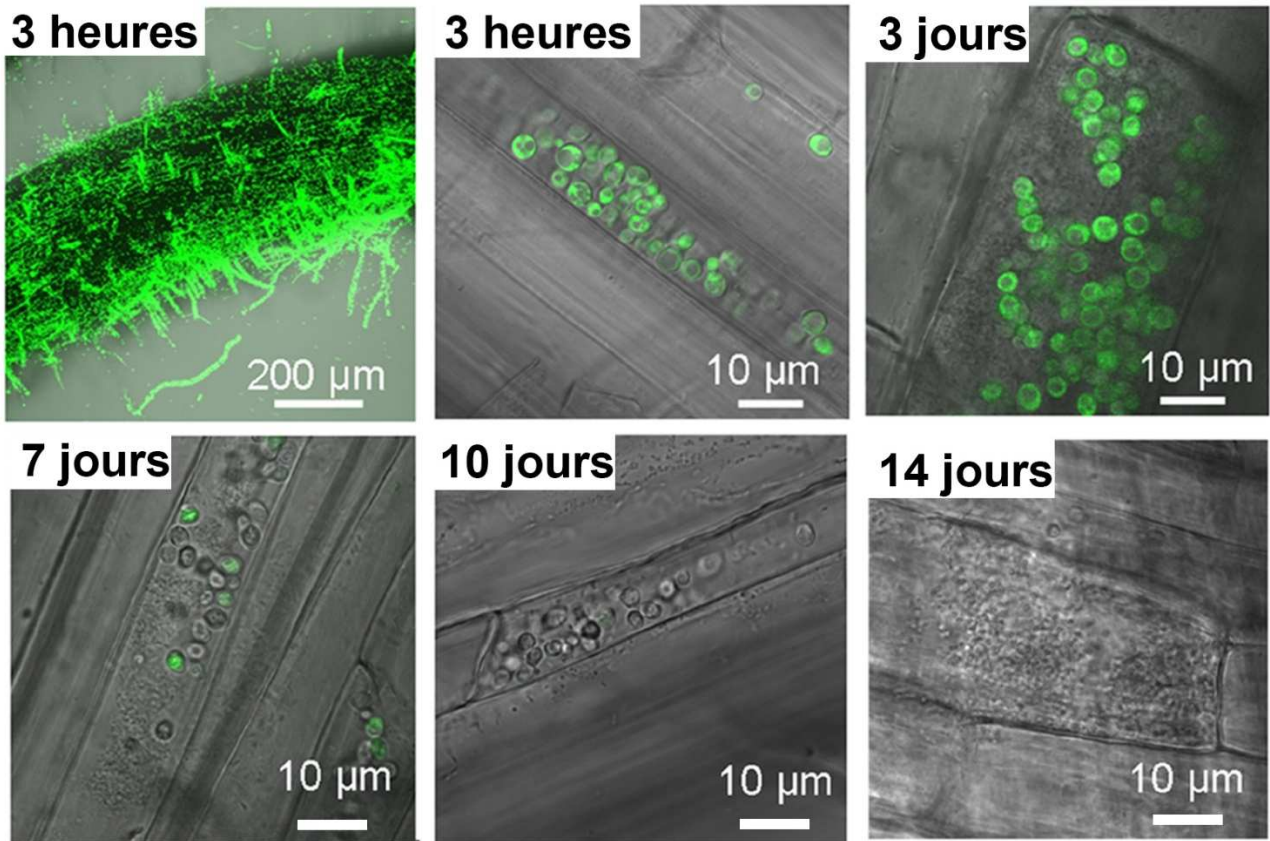
### **Question 9**

Certains clichés du document 6 sont reproduits dans l'**annexe**. Légendez et annotez le plus précisément possible ces images pour localiser les bactéries dans les racines des tomates étudiées.

### **Question 10**

Interprétez les résultats du **document 6**.

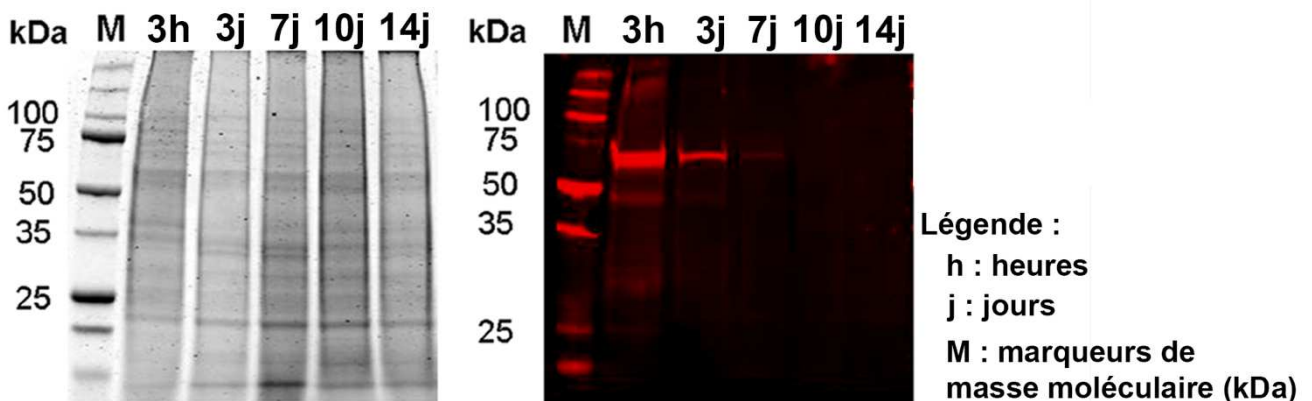
D'autres expériences sont conduites pour comprendre le devenir des micro-organismes mis en contact avec les racines (**document 7**). On utilise cette fois-ci des levures <sup>GFP</sup>*S. cerevisiae*, mais des résultats similaires ont été obtenus avec <sup>GFP</sup>*E. coli*.



**Document 7.** Des plants de tomates dont les racines ont été incubées toute une nuit avec des levures <sup>GFP</sup>*S. cerevisiae* sont suivis par microscopie confocale à balayage laser pendant deux semaines [4]. Dans la construction génétique utilisée pour ces levures, l'expression de la GFP est constitutive, ce qui signifie que le suivi de la fluorescence de la GFP est un bon indice de l'activité biologique des levures.

**Question 11**

À l'aide de l'analyse du **document 7**, caractérisez le devenir des levures au cours de cette expérience.



**Document 8 :** Pour préciser l'interprétation des observations microscopiques du **document 7**, des extraits protéiques des cellules de racines de tomates sont réalisés à chaque étape (3 heures, 3, 7, 10 et 14 jours), puis séparés par électrophorèse en condition dénaturante (*SDS-PAGE*, à gauche), et analysés par *Western-Blot* en utilisant un anticorps anti-GFP (à droite) [4].

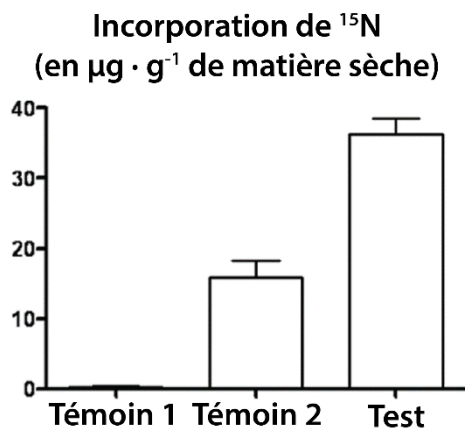


### Question 12

12.1. Expliquez le principe des deux techniques utilisées pour obtenir le **document 8**.

12.2. Justifiez le protocole utilisé dans le **document 8**.

12.3. Interprétez les résultats obtenus et précisez votre réponse sur le devenir des levures durant cette expérience.



**Document 9** : Des racines de plants de tomates sont incubées pendant 1 heure avec la même souche de bactéries *E. coli* utilisée dans le document 6, à ceci près qu'elles ont été cultivées sur un milieu contenant un isotope lourd de l'azote :  $^{15}\text{N}$ .

Après incubation, les racines sont rincées, et les plantes sont cultivées sur un milieu nutritif normal pendant deux semaines. Les nouvelles feuilles subissent alors une analyse isotopique de leur contenu en azote [4].

**Témoin 1** : plants de tomates cultivés sans bactéries  $^{15}\text{N}$ -*E. coli*.

**Témoin 2** : plants de tomates incubés pendant 2 heures dans la solution d'incubation dont les bactéries  $^{15}\text{N}$ -*E. coli* ont été préalablement retirées par filtration.

**Test** : plants de tomates incubés pendant 1 heure dans la solution d'incubation avec des bactéries  $^{15}\text{N}$ -*E. coli*.

### Question 13

13.1. Analysez les résultats du **document 9**.

13.2. Présentez une limite de cette expérience.

### Question 14

On admettra que les processus mis en évidence ci-dessus sont transposables chez les plantes terrestres en conditions naturelles.

14.1. Nommez, à l'aide de vos connaissances, le mode trophique qui qualifie le mieux le phénomène mis en évidence dans les **documents 6 à 9** chez les tomates. Justifiez.

Depuis plusieurs années, certains auteurs utilisent le concept de « mixotrophie » pour qualifier « la particularité physiologique d'un organisme dont les cellules utilisent à la fois la photosynthèse et la matière organique d'origine externe comme source d'éléments carbonés et non carbonés » (Sélosse, Charpin & Not, 2017).

14.2. À la lumière de cette définition, discutez la classification habituelle des types trophiques.

## Thème 4 — Bilan : diversité des flux d'azote chez un végétal terrestre

### Question 15

Construisez un schéma-bilan qui résume les différents flux d'azote entre un végétal terrestre et son milieu, tels qu'ils ont été mis en évidence dans les trois premières parties de ce sujet.

Les informations tirées des différentes espèces végétales étudiées peuvent être intégrées dans le même schéma. Seules les informations issues des documents sont attendues.

**FIN DU SUJET**